

Stofnaam	Sulfadimidine-natrium
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	20 mg/kg
Herhaalbaarheid	7 % bij 200 - 600 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	D
Titel	Diervoeders - Bepaling van sulfadimidine-Na - HPLC. RSVnr A0148, DAMcode 0800302, editie nr. 4, 07-07-94; Bijlagen zijn niet bijgevoegd.

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt tussen 20 en 500 mg/kg sulfadimidine-Na in diervoeders. Het terugvindingspercentage van de methode is 100% (VC = 3,5 ; n = 5), bepaald onder herhaalbaarheidscondities, bij toevoeging van 400 mg/kg sulfadimidine-Na.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 10 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 20 mg/kg.

2 Definitie

N.v.t.

3 Beginsel

Sulfadimidine-Na wordt uit het monster geëxtraheerd met een natriumhydroxideoplossing in een kokend waterbad. Het extract wordt gecentrifugeerd, aangezuurd en opnieuw gecentrifugeerd. Een deel van het extract wordt geneutraliseerd en vervolgens geanalyseerd met "reverse-phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 254 nm. De monsters worden in duplo geanalyseerd.

4 Precisie

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op resultaten van praktijkmonsters.

4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon, dient niet groter te zijn dan 20 mg/kg bij een gehalte van 400 mg/kg in het laboratoriummonster.

4.2 Reproduceerbaarheid

Nog niet vastgesteld.

5 Reagentia en hulpstoffen

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van hogere kwaliteit indien dat vermeld is. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een Milli Q installatie met een minimale specifieke weerstand van $10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ of water van een vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Acetonitril (bv. Merck art. 3)

5.1.2 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.3 Natriumacetaat (bv. Merck art. 6268)

5.1.4 Natriumcarbonaat (bv. Merck art. 6392)

5.1.5 Natriumhydroxide (bv. Merck art. 6498)

5.1.6 Sulfadimidine-Na standaardstof (Lamers en Indemans)

5.1.7 IJsazijn (bv. Merck art. 63)

5.1.8 Zoutzuur gec. (bv. Merck art. 317)

5.2 Oplossingen en verdunningen

5.2.1 Azijnzuuroplossing 10% (v/v)

Meng 10 ml ijsazijn (5.1.7) met 90 ml water in een erlenmeyer.

5.2.2 Eluens HPLC

Meng 800 ml natriumacetaatbuffer (5.2.4) met 200 ml acetonitril (5.1.1). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.7) over een $0,22 \mu\text{m}$ filter (6.11) en ontgas het voor gebruik 10 min met helium of door ultrasonen.

Het eluens is mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt 1 maand houdbaar.

5.2.3 Methanol 50% (v/v)

Meng 500 ml methanol (5.1.2) met 500 ml water. Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten.

5.2.4 Natriumacetaatoplossing 0,01 M pH 6,0

Weeg af 0,82 g natriumacetaat (5.1.3) in een bekglas van 800 ml en los op in ca. 700 ml water. Stel de pH in op 6,0 met 10% azijnzuur (5.2.1) m.b.v. een geijkte pH-meter. Spoel over in een maatkolf van 1 liter, vul aan tot volume met water en meng.

5.2.5 Natriumcarbonaatoplossing 0,2 M

Weeg af 5,3 g natriumcarbonaat (5.1.4) in een maatkolf van 250 ml en los op en vul aan tot volume met methanol 50% (5.2.3).

5.2.6 Natriumhydroxide oplossing 0,5 M

Weeg af 5 g natriumhydroxide (5.1.5) in een maatkolf van 250 ml. Los op in ca. 100 ml water. Vul na afkoelen aan tot volume met water en meng.

5.2.7 Zoutzuuroplossing ca. 0,5 M

Meng in een maatkolf van 500 ml 20 ml zoutzuur (5.1.8) met ca. 300 ml water. Vul aan tot volume met water en meng.

5.2.8 Hoofdstandaardoplossing sulfadimidine-Na (ca. 200 µg/ml)

Weeg af 10 mg (+/- 1 mg) sulfadimidine-Na (5.1.6) op 0,1 mg nauwkeurig in een 50 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met methanol (5.1.2). Registreer de exacte standaardconcentratie, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof.

Deze oplossing dient bij 4 tot 8°C en in het donker bewaard te worden. Onder deze omstandigheden is de oplossing 1 maand houdbaar.

Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016.

5.2.9 Verdunde standaardoplossing (ca. 5 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.8) met een glazen volumepipet 5 ml in een maatkolf van 200 ml. Vul aan tot volume met water en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

5.2.10 Werkstandaardoplossingen (ca. 0,5 en 2,5 µg/ml)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.9) 2 ml en 10,0 ml in afzonderlijke maatkolffjes van 20 ml en vul zo nodig aan met water tot ca. 10 ml. Vul aan tot volume met methanol 50% (5.2.3) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC-analyse (7.6).

6 Apparatuur

6.1 Analytische balans met minimaal een weegbereik van 0 tot 10 gram met een nauwkeurigheid van 0.1 mg (bv. Mettler HL 52)

6.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 0 tot 100 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 g (bv. Mettler PM 460)

6.3 Waterbad 100°C

6.4 Centrifuge 2500 rpm (bv. Mistral 3000E)

6.6 HPLC-opstelling bestaande uit:

- Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
- Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-100 µl (bv. Waters WISP 710B)
- UV-detector (bv. PU 4020 of Diode Array HP 1040A)
- Recorder (bv. Kipp BD-41)
- Voorkolom: Bondapak/Corasil 37-50 µm, 20 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
- Analytische kolom: Chromspher C-18, 5 µm, 200 mm L x 3 mm ID (Chrompack).

6.7 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)

6.8 Ultrasoonbad

6.9 Papierfilters (bv. S & S, 595,5)

6.10 Acrodisc filters 0,45 µm (bv. Gelman 4184)

6.11 Eluensfilter 0,22 µm (bv. Millipore art.83813)

6.12 Waterbad 50°C of indampblok met stikstofvoorziening

6.13 Normaal laboratoriumglaswerk

7 Werkwijze

7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in tweevoud. Neem bij elke serie monsters een blanco monster, een blanco monster met toevoeging van sulfadimidine-Na en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 10 mg/kg sulfadimidine-Na is gevonden. De toevoeging aan de blanco is ongeveer gelijk aan het te verwachten gehalte sulfadimidine-Na in de te meten monsters. Voor een toevoeging van 400 mg/kg wordt 10 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.8) gepipetteerd in een erlenmeyer van 250 ml. Damp met stikstof in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 5 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan alvorens extractiemiddel toe te voegen.

Het blanco monster en het eventuele referentiemonster worden bewaard bij 4 tot 8°C en zijn bij normaal gebruik 1 jaar stabiel.

7.2 Voorzorgsmaatregelen

7.2.1 Veiligheid

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie en huidcontact met de toxische standaardstof en oplosmiddelen te voorkomen. Werk in een afzuigkast en gebruik handschoenen.

7.3 Voorbehandeling van het monster

Het gehele monster (doorgaans 500 g) wordt ter bereiding van het laboratoriummonster behandeld overeenkomstig de voor deze bepaling geldende standaardprocedure welke beschreven is in de projectbeschrijving.

7.4 Proefeenheid

Zie 7.5.1

7.5 Omschrijving procedure

7.5.1 Extractie

Weeg af 5 - 15 g laboratoriummonster, volgens onderstaand schema, in een erlenmeyer van 250 ml:

monsters met 20 - 50 mg/kg: 15 g inweeg op 0,1 g nauwkeurig

monsters met 50 - 300 mg/kg: 10 g inweeg op 0,1 g nauwkeurig

monsters met 300 - 500 mg/kg: 5 g inweeg op 0,1 g nauwkeurig.

Voeg toe ca. 150 ml water en 5 ml natriumhydroxide oplossing (5.2.6). Meng en plaats de erlenmeyer 15 min. in een kokend waterbad, onder af en toe omzwenken. Koel af en spoel het monsterextract zo volledig mogelijk met water over in een maatkolf van 250 ml. Vul aan tot volume met water en meng. Breng een deel van de monsteroplossing over in een centrifugebuis en centrifugeer 10 min. bij 2500 rpm.

7.5.2 Zuivering

Pipetteer van de bovenstaande vloeistof 50,0 ml in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe 3 ml gec. zoutzuur (5.1.8), vul aan tot volume met water en meng. Filtreer over een vouwfilter (6.9) en pipetteer 10,0 ml van het filtraat in een erlenmeyer van 50 ml. Pipetteer hierbij 10,0 ml natriumcarbonaatoplossing (5.2.5) en meng voorzichtig. Filtreer een deel van het extract over een 0,45 µm filter (6.10) en gebruik dit filtraat voor de HPLC-analyse.

7.5.3 HPLC-analyse

7.5.3.1 Meetcondities

Parameter	Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C-18
Analytische kolom	Chromospher C-18
Pompdebiet	0,6 ml/min.
Injectievolume	50 µl
Meetgolflengte	254 nm
Gevoeligheid	0,005-0,08 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min

7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.10) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van sulfadimidine-Na moet symmetrisch zijn ($f_{as} < 2$).

Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende werkstandaardoplossingen. De maximaal toegestane afwijking is 5%. Bij een grotere afwijking worden de werkstandaardoplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens het extract van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de piek van sulfadimidine-Na niet symmetrisch is of niet van de matrix gescheiden is, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen (5.2.10), maximaal vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte sulfadimidine-Na in het monster door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten en/of piekoppervlakten van die werkstandaardoplossing die voor en na het monsterextract geïnjecteerd is en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met het monsterextract.

Enkele karakteristieke UV-chromatogrammen zijn gegeven in bijlage I.

7.5.4 Bevestiging

De Diode Array detector wordt toegepast voor bevestiging van de identiteit van de te bepalen component wanneer het gehalte sulfadimidine-Na in het monster lager is dan 25 mg/kg of wanneer er twijfel bestaat over de piek-zuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte.

De meetcondities zijn dezelfde als bij 7.5.3.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector. Het injectievolume kan eventueel worden vergroot.

7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	254 nm (pilot signal)
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte referentie	100 nm
Ruisinstelling	1 mAu
Spectrum	top, buigpunten, basis
Spectrumbereik	225 - 400 nm
Spectrumstap	2 nm.

7.5.4.2 Procedure

Wacht tot het systeem stabiel is en injecteer de werkstandaard-oplossing van 2,5 µg/ml, de (verdachte) monsterextracten en weer de werkstandaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

7.5.4.3 Evaluatie

Plot de spectra van de monsterpiek, opgenomen in de buigpunten en op de top van de piek t.o.v. de dichtstbijzijnde basis in één figuur. Plot vervolgens in één figuur de spectra van de monsterpiek en van de standaardpiek, opgenomen op de top van de piek t.o.v. de dichtstbijzijnde basis.

7.5.4.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van sulfadimidine-Na wordt bevestigd op basis van de volgende criteria:

- De retentietijd van de monsterpiek moet gelijk zijn (+/- 5%) aan die van de standaardpiek. Bij twijfel wordt dit gecontroleerd door herinjectie van het monsterextract na standaardadditie van sulfadimidine-Na.
- De piekzuiverheid wordt beoordeeld aan de hand van de overeenkomst tussen de spectra van de monsterpiek in de buigpunten en op de top. Er mag per golflengte niet meer dan 15% verschil in de gemeten absorptie waarneembaar zijn.
- De spectra van monster- en standaardpiek, opgenomen op de top van de piek, moeten visueel vergelijkbaar zijn. Vanaf een relatieve absorptie van 10% mogen de spectra per golflengte niet meer dan 15% van elkaar verschillen in de gemeten absorptie. De golf-lengten van de absorptiemaxima van deze twee spectra mogen niet meer dan 2 nm van elkaar verschillen.

8 Resultaten

8.1 Berekening

Het gehalte aan sulfadimidine-Na in het monster uitgedrukt in mg/kg wordt met de volgende formule berekend:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times c_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{100}{R} \times 4 \text{ waarin:}$$

G	=	gehalte sulfadimidine-Na in mg/kg
h_m	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
h_{st}	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
c_{st}	=	concentratie sulfadimidine-Na werkstandaardoplossing in $\mu\text{g/ml}$
V_e	=	volume van de extractieoplossing in ml (250)
m	=	inweeg van het laboratoriummonster in gram
R	=	het (voortschrijdend) gemiddelde terugvindingspercentage berekend over de laatste 5 waarnemingen op hetzelfde niveau. Het terugvindingspercentage wordt berekend als het gevonden gehalte van het monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte in %.

Het uiteindelijke gehalte is het gemiddelde van de duplo-analyses.

9 Registratie

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalten worden weergegeven op het waarnemingsformulier overeenkomstig bijlage II van dit voorschrift. In bijlage III worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, blanco monster, monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery en het referentiemonster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Bij een verschil tussen de duplowaarden groter dan 20 mg/kg bij een gehalte van 400 mg/kg of bij een terugvindingspercentage dat lager is dan 90% of hoger dan 110% vindt herhaling plaats van de analyses.

LITERATUUR

Allred M.C., Dunmire D.L., J. Chrom. Sc. 16 (1978) 533